



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89051

(13) U

(51) МПК

A61K 35/74 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 12670

(22) Дата подання заявки: 30.10.2013

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: 10.04.2014(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 10.04.2014, Бюл.№ 7

(72) Винахідник(и):

Янковський Дмитро Станіславович (UA),
Широбоков Володимир Павлович (UA),
Димент Галина Семенівна (UA)

(73) Власник(и):

Янковський Дмитро Станіславович,
вул. Чумака, 6, кв. 4, м. Київ-65, 03065 (UA),
Широбоков Володимир Павлович,
вул. Терещенківська, 13, кв. 30, м. Київ-004,
01004 (UA),
Димент Галина Семенівна,
вул. Лісковська, 18-а, кв. 172, м. Київ-97,
02097 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА "СИМБІЛАКТ ПРОЛІСОК"

(57) Реферат:

Спосіб одержання мультипробіотика передбачає приготування живильного середовища на молочній основі, культивування клітин полівидового симбіозу, що містить біфідобактерії видів *Bifidobacterium longum* та *Bifidobacterium bifidum*, молочнокислі стрептококи видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* і *Propionibacterium acidipropionici*, лактобацили виду *Lactobacillus helveticus* та оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter aceti*, відділення біомаси, змішування її з захисним середовищем і пакування. Із біфідобактерій додатково використовують штами виду *Bifidobacterium adolescentis*, із лактобацил - штами видів *Lactobacillus casei* і *Lactobacillus plantarum*, як захисне середовище використовують гель смектиту, при цьому біомасу змішують з 3,0-3,5 %-м гелем смектиту у співвідношенні 1:1.

UA 89051 U

Корисна модель належить до біотехнології й може бути використана у виробництві бактеріальних препаратів з пробіотичними властивостями.

У зв'язку з неухильним збільшенням кількості дітей та дорослих, що страждають на захворювання, асоційовані з дисбіозами, поповнення арсеналу засобів пробіотичної терапії новими ефективними препаратами є дуже важливою і актуальною задачею.

Один із напрямків в галузі підвищення ефективності пробіотиків базується на конструюванні стійких полівидових симбіозів фізіологічних бактерій. Успішне поєднання в одному препараті корисних властивостей різних видів пробіотичних бактерій, об'єднаних за допомогою спеціальних методів у багатофункціональні мультисимбіози, дозволяє одержати пробіотик із розширеним спектром біологічних активностей. Серія мультипробіотиків з доведеною лікувально-профілактичною ефективністю розроблена в Україні.

Відомо спосіб одержання бактеріального концентрату "Симбілакт", що передбачає приготування живильного середовища на молочній основі, внесення посівного матеріалу, що містить молочнокислі стрептококи видів *Streptococcus thermophilus* та *Lactococcus lactis*, біфідобактерії виду *Bifidobacterium longum* і *Bifidobacterium bifidum*, пропіоновокислі бактерії виду *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* та оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter acetii*, нарощування біомаси, відокремлення її від культурального середовища, змішування з захисним середовищем, висушування і пакування (Янковський Д.С., Димент Г.С. Використання продуктів мікробного синтезу для підвищення якості ферментованих молочних продуктів // Харчова і переробна промисловість. - 1993. - № 8).

Недоліком способу є використання у складі бактеріального концентрату недостатнього спектра видів бактерій із корисними властивостями та його виготовлення в ліофілізованій формі, що призводить до зниження життєздатності та активності бактеріальних клітин.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання бактеріального концентрату "Симбітер", що передбачає приготування живильного середовища на молочній основі, ферментованій сполученням штамів *Streptococcus thermophilus* ВКПМ В-4741, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ВКПМ В-4541 і *Acetobacter acetii* ВКПМ В-5495, приготування й внесення в живильне середовище посівного матеріалу, що містить біфідобактерії видів *Bifidobacterium longum* і *Bifidobacterium bifidum*, оцтовокислі бактерії видів *Acetobacter acetii* і *Acetobacter pasteurianus*, пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii* і *Propionibacterium acidipropionici*, а також молочнокислі бактерії видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* при співвідношенні симбіозу молочнокислих і оцтовокислих бактерій із симбіозом біфідобактерій, пропіоновокислих і оцтовокислих бактерій, рівному 1:3, нарощування біомаси, відокремлення її від культурального середовища, змішування з захисним середовищем і пакування (Патент РФ № 2088660, С12N1/20, А23С9/12, С12N1/20, С12R1/01, 1997 - прототип).

Бактеріальний концентрат, одержаний відомим способом, характеризується виготовленням в активній рідкій формі, високим вмістом життєдіяльних клітин пробіотичних бактерій та їх метаболітів, високою антагоністичною активністю щодо широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Однак концентрат має строк придатності, обмежений 2 місяцями.

Задачею корисної моделі є створення способу одержання мультипробіотика "Симбілакт пролісок", в якому шляхом розширення видового спектру бактерій із пробіотичними властивостями та використання в якості захисного середовища гелю смектиту, забезпечується підвищення пробіотичної ефективності концентрату та збільшення тривалості терміна його зберігання.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання мультипробіотика "Симбілакт пролісок", що передбачає приготування живильного середовища на молочній основі, культивування клітин полівидового мультисимбіозу, що містить біфідобактерії видів

Bifidobacterium longum та *Bifidobacterium bifidum*, молочнокислі стрептококи видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* і *Propionibacterium acidipropionici*, лактобацили виду *Lactobacillus helveticus* та оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter acetii*, відділення біомаси, змішування з захисним середовищем і пакування, відповідно до корисної моделі, із біфідобактерій додатково використовують штами виду *Bifidobacterium adolescentis*, із лактобацил штами видів *Lactobacillus casei* і *Lactobacillus plantarum*, як захисне середовище використовують гель смектиту, при цьому біомасу змішують з гелем смектиту концентрацією 3,0-3,5 % у співвідношенні 1:1.

Пропонований спосіб передбачає введення до складу мультипробіотика додаткових видів лактобацил та біфідобактерій. Завдяки цьому збільшується антагоністична активність

концентрату, його резистентність до шлункового соку та жовчі, оптимізується спектр корисних мікробних метаболітів.

Відповідно до пропонованого способу, передбачається змішування біомаси з гелем смектиту. Сmekтит (бентоніт) - це природний глинистий мінерал, що має високі вологопоглинаючі, адсорбційні та іонообмінні властивості. Крім цього смектит є цінним джерелом мінералів, корисних для життєдіяльності пробіотичних бактерій, що сприяють покращенню метаболічних процесів в організмі людини.

Гель смектиту, використання якого передбачене пропонованим способом, одержують методом глибокого очищення природного мінералу від забруднюючих мінералів, шкідливих сполук та мікроорганізмів. Одержаний таким способом гель смектиту є потужним стимулятором розвитку цукролітичних бактерій, що становлять основу пробіотика та являються важливим компонентом кишкового біоценозу здорової людини, захищає їх від негативного впливу жовчі і шлункового соку, чинить цитомукопротекторну дію на слизові оболонки травного тракту.

Гель, що застосовується у способі, містить 3,0-3,5 % смектиту. Зниження концентрації смектиту у гелі менше 3 % призводить до зменшення стимулюючої і протекторної дії гелю смектиту щодо пробіотичної мікрофлори. Збільшення концентрації смектиту в гелі понад 3,5 % недоцільно, оскільки не сприяє помітному збільшенню захисних властивостей щодо мікрофлори препарату, але призводить до зайвого ущільнення його консистенції.

3,0-3,5 %-й гель смектиту вводять у біомасу в співвідношенні 1:1. Дана концентрація є найбільш оптимальною. Зміна співвідношення у бік зменшення частки гелю смектиту призводить до зменшення захисного ефекту відносно біомаси, терміну зберігання мультипробіотика та зниження резистентності до природних інгібіторів травного тракту (жовчі та шлункового соку). Збільшення кількості гелю смектиту недоцільно, оскільки призводить до зниження концентрації бактеріальних клітин та їх фізіологічно цінних метаболітів у препараті.

Спосіб здійснюють таким чином.

Для приготування інокуляту використовують мультикомпонентний симбіоз молочнокислих, пропіоновокислих, оцтовокислих і біфідобактерій видів: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Acetobacter acetii*.

Мультикомпонентний симбіоз вносять в стерильне знежирене молоко або 8,0-10,0 %-ну водну суспензію зародків пшениці. Інокульоване живильне середовище витримують протягом 15-18 годин при температурі 35-37 °C.

Для приготування живильного середовища в знежирене молоко з масовою часткою сухих речовин 4-5 % додають органічні стимулятори росту цукролітичних бактерій. Як такі використовують один або декілька із приведених субстратів: гідролізоване молоко, гідролізат казеїну, кукурудзяний екстракт, суспензію зародків пшениці. Підготовлене живильне середовище стерилізують, охолоджують до температури культивування, інокують симбіозом пробіотичних бактерій і інкубують при температурі 35-37 °C для накопичення клітинної біомаси, яку відокремлюють від культуральної рідини центрифугуванням. Одержану біомасу змішують у співвідношенні 1:1 з водним гелем смектиту з концентрацією сухих речовин 3,0-3,5 %.

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1

Для приготування інокуляту у 25 л стерильного знежиреного молока з вмістом сухих речовин 10 % вносять 1,25 л культури мультикомпонентного симбіозу молочнокислих, пропіоновокислих і біфідобактерій наступного видового складу: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, *P. acidipropionici*, *Acetobacter acetii*.

Інокульоване молоко ферментують протягом 18 годин при температурі 36 °C. Готовий інокулят характеризується густою в'язкою консистенцією, кислотністю 95°Т, рН 4,45, концентрацією живих клітин - $1,1 \times 10^9$ КУО/см³.

Для приготування живильного середовища 10 кг сухого знежиреного молока розчиняють в 100 л водопровідної води. До розчиненого молока додають воду (до 200 л) із розрахунку одержання відновленого молока із вмістом сухих речовин 5 %. В молочну основу додають 10 %-ну водну суспензію зародків пшениці у кількості 75 кг (15 %). Одержане живильне середовище стерилізують при температурі 121 °C протягом 35 хвилин. Потім охолоджують до температури 37 °C і вносять 5 % інокуляту. Процес культивування проводять протягом 22 годин при температурі 37 °C і рН 6,5. Клітинну біомасу відокремлюють центрифугуванням і змішують у

співвідношенні 1:1 з 3,0 %-м водним гелем смектиту. Одержаний пробіотик зберігає свої властивості протягом 6 місяців при зберіганні за температури $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Приклад 2

Приготування інокуляту здійснюють, згідно з прикладом 1, за винятком того, що як середовище культивування використовують стерильну водну суспензію зародків пшениці з вмістом сухих речовин 10 %. Для приготування живильного середовища до 400 кг знежиреного молока, одержаного при сепарації незбираного молока, додають питну воду до одержання молочної основи з вмістом сухих речовин 4 %. До одержаної основи додають 10 % гідролізованого молока. Живильне середовище стерилізують при температурі 121°C з витримкою 40 хвилин. Охолоджують до температури 35°C і вносять 6 % інокуляту. Процес культивування проводять протягом 20 годин при температурі 35°C і pH 6,4. Клітинну біомасу відокремлюють центрифугуванням і змішують у співвідношенні 1:1 з водним 3,3 %-м гелем смектиту. Одержаний пробіотик зберігає свої властивості протягом 7 місяців при зберіганні при температурі $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

15 Приклад 3

Приготування інокуляту здійснюють, згідно з прикладом 1. Для приготування живильного середовища до 600 кг знежиреного молока додають питну воду до одержання молочної основи з вмістом сухих речовин 4 %. До одержаної основи додають 8 % кукурудзяного екстракту. Живильне середовище стерилізують при температурі 121°C з витримкою 30 хвилин. Охолоджують до температури 36°C і вносять 4 % інокуляту. Процес культивування проводять протягом 18 годин при температурі 36°C і pH 6,7. Клітинну біомасу відокремлюють центрифугуванням і змішують у співвідношенні 1:1 з водним 3,4 %-м гелем смектиту. Одержаний пробіотик зберігає свої властивості протягом 6,5 місяців при зберіганні при температурі $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

25 Приклад 4

Приготування інокуляту здійснюють, згідно з прикладом 2. Для приготування живильного середовища до 500 кг знежиреного молока додають питну воду до одержання молочної основи з вмістом сухих речовин 4,5 %. До одержаної основи додають 5 % кукурудзяного екстракту та 5 % гідролізату казеїну. Живильне середовище стерилізують при температурі 121°C з витримкою 25 хвилин. Охолоджують до температури 37°C і вносять 5,5 % інокуляту. Процес культивування проводять протягом 19 годин при температурі 37°C і pH 6,8. Клітинну біомасу відокремлюють центрифугуванням і змішують у співвідношенні 1:1 з водним 3,5 %-м гелем смектиту. Одержаний пробіотик зберігає свої властивості протягом 7 місяців при зберіганні за температури $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

35 Таким чином, запропонований спосіб дає змогу одержувати мультипробіотик із широким видовим спектром корисних бактерій та подовженим терміном зберігання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

40 Спосіб одержання мультипробіотика, що передбачає приготування живильного середовища на молочної основі, культивування клітин полівидового симбіозу, що містить біфідобактерії видів *Bifidobacterium longum* та *Bifidobacterium bifidum*, молочнокислі стрептококи видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* і *Propionibacterium acidipropionici*, лактобацили виду *Lactobacillus helveticus* та оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter aceti*, відділення біомаси, змішування її з захисним середовищем і пакування, який **відрізняється** тим, що із біфідобактерій додатково використовують штами виду *Bifidobacterium adolescentis*, із лактобацил - штами видів *Lactobacillus casei* і *Lactobacillus plantarum*, як захисне середовище використовують гель смектиту, при цьому біомасу змішують з 3,0-3,5 %-м гелем смектиту у співвідношенні 1:1.

50